Die Bedeutung der durch Hetol (zimtsaures Natron) hervorgerufenen Hyperleukozytose bei der intravenösen und subkutanen Milzbrand-Infektion des Kaninchens.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen medizinischen Fakultät der Universität München

vorgelegt von

Gottfried Boehm.

München.
Druck von R. Oldenbourg.
1907.

Gedruckt mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität München.

Referent:

Herr Obermedizinalrat Prof. Dr. **Max Gruber.**

Durch die Beobachtungen von Gruber und Futaki[1]) wurde die Aufmerksamkeit wieder auf die Phagozyten als kräftige Vernichter der Milzbrandbazillen hingelenkt. Es war auf Grund dieser Beobachtungen die Vermutung gerechtfertigt, dafs der grofse Unterschied der Gefährlichkeit intravenöser und subkutaner Einverleibung von Milzbrandbazillen, der von Noetzel[2]) beobachtet worden ist, seine Erklärung finden könnte, und ich unternahm auf Veranlassung von Herrn Obermedizinalrat Prof. Dr. Max Gruber Versuche über den Einflufs der Hyperleukozytose auf den Erfolg der Infektion des Kaninchens mit genau abgestuften Dosen von virulenten Milzbrandbazillen.

Derartige Versuche sind schon von verschiedenen Autoren angestellt worden. Nachdem durch die Untersuchungen von Metschnikoff festgestellt war, dafs die Leukozyten bei der Bekämpfung bakterieller Invasionen in den tierischen Organis-

1) Zentralbl. f. Bakt., Parasitenkunde u. Infektionskrankheiten, Bd. 38, 1906. Beiheft.

2) Archiv f. klinische Chirurgie, 1900.

mus eine grofse Rolle spielen, wurde bald versucht, durch künstliche Vermehrung der Leukozyten im Blute die Widerstandskraft von Versuchstieren gegen Infektionen zu steigern.

Noch bevor die Wirkung der Hyperleukozytose auf bakterielle Infektionen allgemein bekannt war, fanden Wooldridge[1]), Wright[2]), Zacharoff[3]), Brieger, Kitasato und Wassermann[4]) und Grammatschikoff[5]), dafs nach Injektion von Thymus-, Hoden-, Lymphdrüsen- und Spermaextrakten die Widerstandskraft der Versuchstiere gegen Milzbrand gesteigert wurde, und man glaubte, dafs diesen Stoffen spezifisch immunisierende Kräfte eigen seien. Erst aus späteren Versuchen ging hervor, dafs die Erklärung der günstigen Wirkung in der von diesen Stoffen hervorgerufenen Hyperleukozytose zu suchen ist.

Die Mehrzahl der Autoren bedienten sich dann nicht des Milzbrandbazillus, um den Einflufs der Hyperleukozytose zu studieren, sondern anderer Krankheitserreger. So schützte Victor Vaughan[6]) Kaninchen durch Injektion von Nukleïnsäure vor den schädlichen Folgen einer Infektion mit dem Diplococcus pneumoniae, und Loevy und Richter[7]) teilten in einem kurzen Bericht ebenfalls günstige Resultate der Hyperleukozytose bei der Pneumokokkeninfektion mit.

Dann folgte die sehr eingehende Arbeit von Jacob.[8]) Dieser injizierte seinen Versuchskaninchen Lösungen von Albumosen, und da durch diese nicht nur eine Vermehrung der Leukozyten, sondern, dieser vorausgehend, auch eine starke Hypoleukozytose verursacht wird, konnte er sowohl den Einflufs der Hypo- als auch den der Hyperleukozytose auf die

1) Wooldridge, Archiv für Anatomie und Physiologie, physiol. Abt. Bd. III, 1883.

2) Wright, Brit. med. Journ., 1891.

3) Zacharoff, Zentralblatt für Bakteriologie, 17.

4) Brieger, Kitasato u. Wassermann, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 12.

5) Grammatschikoff, Annales de l'institut Pasteur, 1893.

6) Kongrefs in Budapest (Ref. Zentralbl. f. Bakteriol., Bd. 16).

7) Deutsche med. Wochenschr., 1895.

8) Zeitschr. f. klin. Medizin, 1896.

Pneumokokkeninfektion studieren. Er fand, »dafs wenn ein Tier im Stadium der durch subkutane oder intravenöse Injektion bedingten Hypoleukozytose infiziert wurde, dasselbe stets zugrunde ging, und zwar meist schneller als das betreffende Kontrolltier. Dagegen war es von äufserst günstigem Einflufs auf den Krankheitsverlauf, wenn die Infektion zur Zeit der Hyperleukozytose geschah, und zwar im aufsteigenden Ast derselben.«

Blumreich und Jacobi[1]) steigerten die Leukozytenzahl bei Kaninchen durch Milzexstirpation und fanden, dafs bei Pyocyaneus- und Cholera-Infektion die Widerstandskraft der entmilzten Tiere gegen die der normalen bedeutend gestiegen war.

Im Jahre 1898 veröffentlichten Loevy und Richter[2]) ihre schon 1895 kurz mitgeteilten und bis dahin weiter ausgeführten Versuche über den Einflufs der Hyperleukozytose auf Hühnercholerabazillen und Pneumoniediplokokken. Als leukozytoseerregende Mittel kamen, — abgesehen von dem wegen seiner Nebenwirkungen bald verlassenen Pilokarpin — Spermin und Nukleïn zur Verwendung. Die Erfolge bei den Hühnercholerainfektionen waren geringe. Am günstigsten gestalteten sich die Versuche mit den Pneumokokken.

Über den Einflufs der Hyperleukozytose auf die Milzbrandinfektion finden wir nur Angaben von Pawlowsky[3]), M. Hahn[4]) und Blumreich und Jacobi.[5]) Pawlowsky sah nach Injektion leukozytoseerregender Proteïne günstige Wirkung auf die Milzbrandinfektion. Hahn benutzte zur Vermehrung der Leukozyten »ein Albumosengemenge, das aus feuchtem Fibrin durch Verdauung mit 2proz. Papajotinlösung hergestellt war . . . .« Der Erfolg der Hyperleukozytose bestand meist in einer Verzögerung des Verlaufs der Milzbrandinfektion, aber

1) Berliner klin. Wochenschr., 1897, S. 444.
2) Virchows Archiv, Bd. 151, S. 220.
3) Mitteilungen des XI. internationalen Kongresses.
4) Archiv f. Hygiene, Bd. 28, 1897.
5) a. a. O.

nur in zwei Fällen trat vollkommene Heilung ein. Hahn schiebt die Schuld der geringen Wirkung hauptsächlich auf den Umstand, dafs die Hyperleukozytose beim Kaninchen nach einmaliger Injektion des die Leukozyten anlockenden Mittels von sehr kurzer Dauer zu sein pflegt. Blumreich und Jacobi endlich fanden im Gegensatz zu ihren Erfolgen gegen Pyocyaneus- und Cholerainfektion nach Exstirpation der Milz bei Milzbrandinfektion keinen Unterschied gegen die Normaltiere.

Durch die bisher veröffentlichten Versuche ist also der schädigende Einflufs der Hyperleukozytose auf eine ganze Reihe pathogener Mikroorganismen unzweifelhaft festgestellt. Nur beim Milzbrand waren die Erfolge schwankend, und da dieser Bazillus, wie u. a. auch neuerdings aus Versuchen von R. Schneider, Gruber und Futaki hervorgeht, bezüglich seines Verhaltens im tierischen Organismus gewissermafsen eine Sonderstellung einnimmt, war es von besonderem Interesse, die vorhandenen Erfahrungen durch neue Versuche zu erweitern.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde zur Erzeugung der Hyperleukozytose stets das Hetol (zimtsaures Natron) Landerer verwendet. Landerer[1]) selbst stellte seit dem Jahre 1882 zahlreiche Versuche über die Wirkung der Zimtsäure und ihrer Salze am tierischen und menschlichen Organismus an, und kennzeichnet sie als ungiftige, weder Blut noch Nieren schädigende Stoffe. — Im selben Sinne äufserten sich u. a. Richter[2]) und Spiro[3]), die auch speziell die Wirkung der Zimtsäure auf das Blut untersuchten. Ihre hierauf bezüglichen Ergebnisse seien in Kürze hier zusammengefafst.

Sie benutzten zur intravenösen Injektion beim Kalt- und Warmblüter 1—5proz. Lösungen von zimtsaurem Natrium und

1) Münchener med. Wochenschr., 1888, 1889.
Deutsche med. Wochenschr., 1890 und 1893.
»Die Behandlung der Tuberkulose mit Zimtsäure«, 1892.
Vortrag auf dem Tub.-Kongrefs Berlin 1899.
Berliner Klinik 1901.
2) Virchows Archiv, Bd. 133.
3) Inaug.-Dissert., 1893.
2 u. 3) Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol., 1894.

fanden, was zunächst die Zahlenveränderungen der Leukozyten anlangt, im Durchschnitt 3—4 Stunden nach einmaliger Injektion eine etwa 3—4 fache Vermehrung, die bis über 90% auf Rechnung der polynukleären Formen zu setzen war. Zum Vergleich mit meinen, weiter unten angeführten Resultaten sei hier kurz eine ihrer Tabellen wiedergegeben:

Versuch mit einer Lösung von zimtsaurem Natrium (injiziert 0,5 g in die Ohrvene eines Kaninchens):

Vor der Injektion	9406	Leukozyten
2 Stunden nach der Injektion . .	13736	»
4 » » » » . .	34204	»
20 » » » » . .	16122	»
24 » » » » . .	8100	»

Bezüglich der Arten der Leukozyten stellten Richter und Spiro fest, dafs, wie schon oben erwähnt, die polynukleären Zellen in der Überzahl waren; sie fanden im Durchschnitt ein Anwachsen der polymorphkernigen Formen um 20—30%.

Um mich durch eigene Anschauung von der Wirkungsweise des Hetols zu überzeugen, prüfte ich die bezüglich der farblosen Blutzellen oben zitierten Ergebnisse nach und konnte sie im grofsen und ganzen bestätigen. Es sei mir gestattet, mein Vorgehen, da es bei allen Versuchen das gleiche war, etwas eingehender zu schildern.

Es kam stets eine 5proz., d. h. nahezu gesättigte Hetollösung in physiologischer Kochsalzlösung zur Verwendung. Diese wurde vor der Injektion stets filtriert und 7—10 Minuten im kochenden Wasserbad sterilisiert. Dann wurden regelmäfsig 10 ccm dieser Lösung (also 0,5 g Hetol in Substanz) nach Rasur und Sterilisierung der betreffenden Ohrpartie in die grofse Sammelvene des Ohrs injiziert. Geringere Mengen und weniger konzentrierte Lösungen hatten keine so prompte und hohe Hyperleukozytose zur Folge. Es wurde daher von Anfang an von der Verringerung des Injektionsquantums Abstand genommen. Ich sah auch, mit Ausnahme von 2—3 Fällen, in denen die Tiere eine schnell vorübergehende Schwäche zeigten, niemals einen ungünstigen Einfluſs der Hetolinjektion.

Schon 2—4 Stunden nach der Injektion erreichte die Zahl der Leukozyten in der Regel den 2—4fachen Wert der Norm, und schon im Laufe der 4. bis 5. Stunde war der Höhepunkt überschritten. Zur Illustration seien einige Versuche wiedergegeben.

Protokolle:

Kaninchen Nr. 19. — 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in die Ohrvene injiziert, vorher Zählung der Leukozyten:

Vor der Injektion	8 800	Leukozyten
5 Stunden nach der Injektion . . .	29 000	»
7 » » » » . . .	13 000	»

Kaninchen Nr. 23. — 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in die Ohrvene injiziert, vorher Zählung der Leukozyten:

Vor der Injektion	6 400	Leukozyten
2 1/2 Stunden nach der Injektion . .	21 400	»
3 1/2 » » » » . .	21 200	»
4 1/2 » » » » . .	16 000	»

Kaninchen Nr. 24. — 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in die Ohrvene injiziert, vorher Zählung der Leukozyten:

Vor der Injektion	8 200	Leukozyten
2 1/2 Stunden nach der Injektion . .	23 000	»
3 1/2 » » » » . .	20 800	»
4 1/2 » » » » . .	15 000	»

Es ist also bei meinen Versuchen der Ablauf der Hyperleukozytose ein etwas schnellerer gewesen als bei denen von Richter und Spiro; solche geringe Unterschiede erklären sich aber wohl ohne weiteres durch die Schwankungen in der Reaktionsweise verschiedener Kaninchenarten.

Da ich bei der Durchsicht der Literatur eine Angabe von F. Charteris und E. Provau-Cathart[1]) fand, welche, entgegen den Aufstellungen von Landerer, Richter und Spiro[2]) behaupten, dafs nach der intravenösen Hetolinjektion beim Kaninchen die Vermehrung der Leukozyten beinahe völlig durch die mononukleären Formen bewirkt sei, kontrollierte ich auch das Blutbild vor und nach der Injektion. Die Blutpräparate wurden zu diesem Zweck nach der Mayschen Methode herge-

1) Journ. f. Pathol. u. Bakteriol. 10, zitiert nach Malys Jahresber. 1904/05.
2) a. a. O.

stellt und gefärbt, und es ergaben sich folgende Verhältniszahlen:

A. Zahl der Leukozyten vor dem Versuch . . .	8 800
davon: grofse einkernige Leukozyten	14 %
Lymphozyten	69 %
polynukleäre Leukozyten	17 %.

Als absolute Zahlen wurden aus den Prozentzahlen berechnet:

grofse einkernige Leukozyten	1 232
Lymphozyten	6 072
polynukleäre Leukozyten	1 496.

B. Zahl der Leukozyten $4^1/_2$ Stunden nach der Hetolinjektion	22 000
davon: grofse einkernige Leukozyten	4 %
Lymphozyten	46 %
polynukleäre Leukozyten	50 %.

Als absolute Zahlen wurden aus den Prozentzahlen berechnet:

grofse einkernige Leukozyten . . .	880
Lymphozyten	10 120
polynukleäre Leukozyten	11 000.

Wenn ich auch so hohe Prozentsätze der polymorphkernigen Zellen, wie sie Richter und Spiro fanden (— etwa 50 % im normalen und bis zu 90 % im vorbehandelten Blut) nicht konstatieren konnte, so geht doch ebenfalls aus dem angeführten Beispiel hervor, dafs die polynukleären Formen die Hauptrolle bei der durch Hetol hervorgerufenen Hyperleukozytose spielen. Wenn auch die Zahl der Lymphozyten eine geringere Zunahme erfährt, so kann doch von einer überwiegenden Vermehrung dieser Zellen nicht die Rede sein.

Bevor ich daran gehen konnte, den Einfluſs der Hetolvorbehandlung auf die Milzbrandinfektion zu studieren, mufste ich zunächst für den mir zur Verfügung stehenden Milzbrandstamm die Maximaldosen, ausgedrückt durch die mit Hilfe des Plattenverfahrens kontrollierten Zahlen der eingeführten Milzbrandkeime, feststellen. Über die Grenzwerte der von Kaninchen vertragenen Milzbrandkeimzahlen lagen, wie ich bereits eingangs erwähnt habe, ausführliche Versuche von W. Noetzel[1]) vor, und es

1) a. a. O.

handelte sich im wesentlichen um Nachprüfung seiner Resultate im Sinne der Feststellung eines eventuellen Unterschiedes seines und meines Milzbrandstammes.

In seinen Untersuchungen über die Wege der Bakterienresorption von frischen Wunden konstatierte Noetzel, dafs 2000 Keime eines Milzbrandstammes intravenös und intraperitoneal gut vertragen wurden, während 50 Keime desselben Stammes, subkutan appliziert, sicher tödlich wirkten. Bei der intravenösen Infektion bediente er sich der Vena jugularis. Diese wurde ausgiebig freigelegt und das Operationsfeld durch sterile Gaze vor etwa daneben geratener Bakterienaufschwemmung geschützt. Nach doppelter Unterbindung wurde dann das durch die Injektion verletzte Venenstück reseziert. Er selbst erwähnt in seiner Arbeit Bunges Verfahren, der die Ohrvene zur Infektion benutzte und das betreffende Ohr nach drei Minuten mit dem Paquelin amputierte, um zu verhindern, dafs an der Einstichstelle sich festsetzende und zur Vermehrung kommende Milzbrandkeime von da sekundär in die Blutbahn gelangten, und so eine genaue intravenöse Dosierung unmöglich machten.

Bei der Feststellung der Virulenz unseres Stammes bediente ich mich, wie Bunge, der Ohrvene, da Noetzels Verfahren viel schwieriger ohne Infektion der Wunde auszuführen ist, und da ich fürchtete, dafs die grofse Wunde am Hals einen locus minoris resistentiae gegenüber einer sekundären Milzbrandinfektion vom Blute aus bilden könnte.

Die die Einstichstelle enthaltende Ohrpartie schaltete ich teils durch Abklemmen, teils genau nach Bunges Vorgehen, durch Abtragen mit dem Paquelin aus dem Kreislauf aus. Die Klemme blieb liegen, bis das distale Ende durch trockene Gangrän abgestofsen war, was innerhalb weniger Tage geschah.

Die subkutane Infektion erfolgte stets in das Unterhautzellgewebe am Bauche, nachdem die betreffende Hautstelle rasiert und nach Möglichkeit sterilisiert war.

Zur Infektion dienten 7—8 Stunden bei 37° gezüchtete Agarstrichkulturen, also ein aller Wahrscheinlichkeit nach völlig sporenfreies Material. Nach feiner, etwa 2—3 Minuten langer

Zerteilung und Zerreibung einer kleinen, mit dem Plattenmikroskop als rein erkannten Partie der Kultur auf dem Nährboden wurde die geeichte Öse gefüllt, auf beiden Seiten glatt verstrichen und dann in 0,85 proz. steriler Kochsalzlösung, der auf 100 ccm 1,0 ccm steriler Bouillon beigemengt war, aufgeschwemmt. Auf diese Weise konnte die beabsichtigte Keimzahl fast immer durch die entsprechenden Verdünnungen erreicht werden. Bei allen Infektionen wurde die Dosis durch das Plattenverfahren kontrolliert. Nach der Infektion des Tieres wurden stets behufs Feststellung der Zahl der injizierten Keime entweder mit derselben Pravazspritze, die zur Injektion benutzt worden war oder mittels geeichter Kapillarpipetten genau gemessene Mengen derselben Bakterienaufschwemmung zu Gelatine- oder Agarplatten verarbeitet.

Die folgenden Tabellen enthalten die Resultate meiner sämtlichen Versuche am normalen Tier. Aufserdem sei es mir gestattet, die Ergebnisse von Versuchen beizufügen, die Herr Dr. K. Futaki mit demselben Milzbrandstamm erhalten und mir in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt hat. Es sei dazu noch erwähnt, dafs Futaki zur intravenösen Infektion in der Mehrzahl der Fälle die vena jugularis benutzte. Nur in zwei Fällen bediente er sich der Ohrvene. Die subkutanen Impfungen wurden wie die meinigen ausgeführt.

A. Subkutane Infektion.

Nr. des Versuchstiers	Gewicht g	Keimzahl	Lebensdauer	Todesursache	Ödem	Bemerkungen
7	3000	20	überlebt	—	—	—
29	2200	25	16 Tage	nicht Milzbrand	—	—
30	2500	50	überlebt	—	—	—
31	2300	75	5 Tage	Milzbrand	+	—
50	1470	200	überlebt	—	—	wahrscheinlich refraktär
56	1600	200	3 Tage	Milzbrand	+	—
59	2170	900	überlebt	—	—	wahrscheinlich refraktär
62	2300	5000	2 Tage	Milzbrand	+	—
67	2520	5000	3 Tage	Milzbrand	+	—

A_1. Subkutane Infektion nach Futaki.

Nr. des Versuchstiers	Gewicht g	Keimzahl	Lebensdauer	Todesursache
477	2200	75	7 Tage	nicht Milzbrand
478	2100	75	überlebt	—
479	2300	75	7 Tage	nicht Milzbrand
474	2000	90	überlebt	—
475	2100	90	14 Tage	nicht Milzbrand
476	2200	90	18 »	» »
465	2950	100	5 »	Milzbrand
466	2950	100	7 »	»
467	2350	100	9 »	»
468	1720	100	8 »	»
469	2200	100	8 »	»
470	1900	100	8 »	»
471	3020	100	7 »	»
472	3020	100	8 »	»
473	3170	100	5 »	»

B. Intravenöse Infektion.

Nr. des Versuchstiers	Gewicht g	Keimzahl	Lebensdauer	Todesursache	Ödem am Ohr
11	1950	1000	überlebt	—	—
13	1800	1500	4 Tage	Milzbrand	—
15	2000	2000	überlebt	—	—
14	1700	2500	3 Tage	Milzbrand	—
9	2000	3000	3 »	»	—
34	2300	3000	3 »	»	—
33	2330	4500	3 »	»	—
32	2350	6000	3 »	»	—

B_1. Intravenöse Infektion nach Futaki.

Nr. des Versuchstiers	Gewicht g	Keimzahl	Lebensdauer	Todesursache	Infektionsstelle
607	2200	60	überlebt	—	V. jugularis
615	2070	140	»	—	»
538	1750	640	»	—	Ohrvene
535	1750	1070	»	—	»
543	?	1210	»	—	V. jugularis
546	2200	1430	14 Tage	nicht Milzbrand	»

Es ergibt sich aus diesen Tabellen, dafs man Kaninchen von 2—3 kg Körpergewicht, mit einer Ausnahme — Tod auf 1500 Keime — bis zu 2000 Keime in die Blutbahn bringen konnte, ohne dafs irgendeine nachteilige Wirkung für das Tier zu konstatieren gewesen wäre. Bei subkutaner Impfung wurden 50 Keime mit Sicherheit vertragen, während Infektionen mit über 100 Keimen stets tödlich verliefen. Zu diesen Zahlen mufs bemerkt werden, dafs unser Milzbrandstamm in langen Fäden wächst, so dafs ein einziger Faden eine sehr grofse Zahl von Zellen enthält. Die tödlichen Dosen des von mir verwendeten Milzbrandstammes decken sich also fast genau mit den von Noetzel gefundenen Zahlen.

Da der Höhepunkt der Hetol-Hyperleukozytose schon nach 3—4 Stunden erreicht wird, es aber, wie auch Jacob beobachtete (s. oben), für eine ausgiebige Wirksamkeit der Hyperleukozytose von Wichtigkeit ist, dafs die Infektion in den aufsteigenden Ast derselben fällt, applizierte ich die Keime stets 2—$2^1/_2$ Stunden nach der Hetolinjektion. Dem relativ schnellen Absinken der Hyperleukozytose durch eine erneute Hetolgabe vorzubeugen, war aus folgendem Grunde nicht angezeigt. In kurzen Intervallen aufeinanderfolgende Injektionen von 10 ccm in die Blutbahn wären schwerlich ohne Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens geblieben, hätten also die beabsichtigte günstige Wirkung womöglich kompensiert. Aufserdem waren in vielen Fällen beide Ohren, das eine für die Hetol-, das andere für die Milzbrandinjektion verbraucht, und somit keine Möglichkeit mehr gegeben, die Stichwunden späterer Hetolinjektionen aus dem Kreislauf zu eliminieren. Jede frische Wunde hätte aber für durch den Kreislauf verschleppte Keime einen Nährboden geschaffen, und durch die Vermehrung der Milzbrandbazillen an einer solchen Stelle wäre die genaue Dosierung illusorisch gemacht worden.

I. Einfluſs der Hetolvorbehandlung auf intravenöse Milzbrandinfektion.

Es wurden im ganzen 14 intravenöse Infektionen nach Vorbehandlung mit 5 proz. Hetollösung ausgeführt, von denen fünf wegen zu hoher Dosis (über 6000 Keime) nicht mitangeführt werden sollen. Sie endeten alle fünf tödlich.

Die übrigbleibenden neun verliefen wie folgt:

Protokolle:

A. Tödlich verlaufene Infektionen.

(Die Versuche sind nach der Höhe der Dosis geordnet.)

1. Kaninchen 41. — Gewicht 1900 g.
   19. X. 1/4 Uhr: Infektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in die eine Ohrvene.
   1/6 Uhr: Infektion mit 2100 Milzbrandkeimen in die Vene des anderen Ohres. Injektionsstellen abgeklemmt.
   20. X. Gewicht 1950 g. Keine Ödeme.
   22. X. Gewicht 1800 g exitus.

Sektion: Milz vergröſsert.
Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

2. Kaninchen 26. — Gewicht 2170 g.
   10. IX. 3 15 Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.
   5 25 Uhr: Infektion mit 4500 Milzbrandkeimen in dieselbe Vene. Injektionsstellen abgeklemmt.
   11. IX.: Gewicht 2020 g. Keine Ödeme.
   12. IX.: Gewicht 1940 g. Geringes Ödem proximal der Klemme.
   13. IX.: Gewicht 1700 g. Ödem stärker.
   14. IX.: Exitus.

Sektion: Milz vergröſsert, am Ohr deutliches Ödem.
Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

3. Kaninchen 44. — Gewicht 1450 g.
   25. X. 3 30 Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in die eine Ohrvene.
   6 Uhr: Infektion mit 4500 Milzbrandkeimen in die andere Ohrvene. Beide Ohren wurden in der Nähe der Wurzel mit dem Paquelin abgetragen.
   26. X.: Gewicht 1450 g. Keine Ödeme.
   27. X.: Exitus.

Sektion: Beiderseits lobulärpneumonische Herde, Milz vergröſsert.
Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

4. Kaninchen 39. — Gewicht 2750 g.

19. X. 3^{30} Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.

5^{30} Uhr: Infektion mit 4900 Milzbrandkeimen in die Vene des anderen Ohres. Injektionsstellen beiderseits abgeklemmt.

20. X.: Gewicht 2700 g. Keine Ödeme.

22. X.: Gewicht 2550 g. An beiden Ohren geringe Schwellung.

23. X.: Gewicht 2550 g. Exitus.

Sektion: Die Ohren proximal der Klemmen, beide deutlich ödematös, Milz vergrößert, Pneumonie beiderseits.

Ausstriche: (Herzblut, Lungen- und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

5. Kaninchen 27. — Gewicht 1700 g.

10. IX. 3^{25} Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.

5^{35} Uhr: Infektion mit 6000 Milzbrandkeimen in dieselbe Ohrvene, Injektionsstellen abgeklemmt.

11. IX.: Gewicht 1720 g. Keine Ödeme.

12. IX.: Gewicht 1700 g. Keine Ödeme.

13. IX.: Gewicht 1670 g. Keine Ödeme.

14. IX.: Exitus.

Sektion: Milz vergrößert.

Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

6. Kaninchen 43. Gewicht 1800 g.

25. X. 3^{15} Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in die eine Ohrvene.

6 Uhr: Infektion mit 6000 Milzbrandkeimen in die Vene des anderen Ohrs. Beide Ohren an der Wurzel mit dem Paquelin abgetragen.

26. X: Gewicht 1880 g. Keine Ödeme.

27. X.: Gewicht 1870 g. Keine Ödeme.

29. X.: Gewicht 1880 g. Exitus.

Sektion: Milz vergrößert.

Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

B. Überstandene Milzbrandinfektionen.

7. Kaninchen 21. — Gewicht 2570 g.

3. VIII. 11 Uhr Vorm.: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.

5 Uhr Nachm.: Infektion mit 3000 Milzbrandkeimen. Die Injektionsstellen wurden abgeklemmt.

Das Tier lebt ohne Gewichtsabnahme und Krankheitserscheinungen bis zum 15. VIII. An diesem Tage exitus.

Sektion: o. B.
Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) steril.
Todesursache nicht Milzbrand.

8. Kaninchen 40. — Gewicht 2100 g.
19. X. 3^{30} Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene,
5^{30} Uhr: Infektion mit 3500 Milzbrandkeimen in die Vene des anderen Ohrs. Beide Ohren abgeklemmt.
20. X.: Gewicht 2150 g. Kein Ödem.
22. X.: Gewicht 2100 g. Geringes Ödem des Ohres, an dem die Hetolinjektion vorgenommen wurde.
23. X.: Gewicht 2150 g. Ödem besteht noch.
24. X.: Gewicht 2126 g. Ödem fast ganz zurückgegangen.
25. X.: Gewicht 2170 g. Ödem verschwunden.
29. X.: Gewicht 1850 g. Kein Ödem.
3. XI.: Gewicht 2150 g. Kein Ödem.
9. XI.: Gewicht 2050 g. Kein Ödem.
19. XI.: Gewicht 1820 g. Kein Ödem. Exitus.

Sektion: Rechte Lunge pneumonisch, rechte Pleura und das Perikard zeigen dicke fibrinöse Auflagerungen, linke Lunge auch leicht pneumonisch, linke Pleura frei.
Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) steril, Lunge: kurzes Stäbchen.
Todesursache nicht Milzbrand.

9. Kaninchen 25. — Gewicht 2000 g.
10. IX. 3 Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.
5^{25} Uhr: Infektion mit 5250 Milzbrandkeimen in die Vene des anderen Ohres. Beide Ohren abgeklemmt.
11. IX.: Gewicht 2020 g. Keine Ödeme.
12. IX.: Gewicht 1980 g. Keine Ödeme.
15. IX.: Gewicht 1850 g. Keine Ödeme.
18. IX.: Gewicht 1650 g. Keine Ödeme.
25. IX.: Gewicht 1650 g. Keine Ödeme.
29. IX.: Gewicht hat nicht mehr abgenommen, die distalen Enden beider Ohren sind abgefallen. Das Tier zeigt keine Krankheitserscheinungen. Die Infektion kann als überstanden betrachtet werden.

Zur besseren Übersichtlichkeit sei diese Versuchsreihe in einer Tabelle (S. 17) kurz zusammengefafst.

Die Entstehung der Odeme in den Fällen 2, 4 und 8 kann man sich auf zweierlei Weise erklären. Entweder sind durch den Zug der am Ohr hängenden Klemme kleinere innere Gewebszerreifsungen verursacht worden, die den Nährboden für eine

sekundäre Ansiedlung und Vermehrung von Milzbrandbazillen abgegeben haben. In diesem Falle wäre also die Schwellung als Milzbrand-Ödem aufzufassen. Eine primäre, lokale Infektion, die durch die Injektion der Bakterienaufschwemmung verursacht worden wäre, ist ohne weiteres auszuschliefsen, da sich der Einstich stets in der Nähe der Ohrspitze befand, und die Klemme, weit davon entfernt, in der Nähe der Ohrwurzel angelegt wurde.

Tabelle I.

Nr. des Versuchs	Zahl der eingebrachten Keime	Ödeme	Gewichtsveränderung in g	Tod an Milzbrand nach	Bemerkungen
1.	2100	—	— 100	3 Tagen	—
7.	3000	—	—	—	—
8.	3500	vorübergehend am Hetolohr	— 280	—	—
2.	4500	am Ohr, das beiden Injektionen diente	— 470	4 Tagen	—
3.	4500	—	—	2 »	—
4.	4900	an beiden Ohren	— 200	4 »	—
9.	5250	—	— 350	—	wahrscheinlich refraktär
5.	6000	—	— 30	4 Tagen	—
6.	6000	—	+ 80	4 »	—

Die andere Erklärung könnte man nach den Beobachtungen Spiros[1]) darin suchen, dafs bei der Injektion der grofsen Menge Hetollösung ein Teil davon in das subkutane Gewebe ausgetreten sei und sich dort eine von dem chemotaktisch wirkenden Hetol leicht verursachte seröse Entzündung ohne Mitwirkung von Mikroorganismen gebildet habe. In allen Fällen von Ohrödem konnten Milzbrandbazillen in der Ödemflüssigkeit mit dem Mikroskop nachgewiesen werden. Dieser positive Befund an sich kann aber noch nicht genügen, um die Ödeme alle als Milzbrandödeme zu kennzeichnen, denn Milzbrandkeime werden während der Agone über das ganze Gefäfssystem verstreut und die im Mikroskop gefundenen könnten aus Kapillaren stammen, die bei dem zur Entnahme der Ödemflüssigkeit unumgänglichen Ein-

1) Inaugural-Dissertation 1893, S. 22.

schnitt angeschnitten worden sind. Die Untersuchung der Ödemflüssigkeit während des Lebens verbot sich wegen der unvermeidlichen Wunde von selbst. Im Fall 4 spricht das Auftreten des Ödems an beiden Ohren für die erste Art der Erklärung, während im Fall 8 die Entstehung des Ödems allein an dem Ohr, das der Hetolinjektion diente, und der harmlose Verlauf die zweite Erklärung näherliegend erscheinen läfst.

Den günstigen Verlauf in den Fällen 7, 8 und 9 könnte man durch eine Erhöhung der Widerstandskraft infolge der Hetolvorbehandlung erklären, denn in allen drei Fällen übersteigt die verabreichte Keimzahl, wenn auch nicht sehr erheblich, die vom normalen Kaninchen vertragenen Dosen. Bei der geringen Differenz wäre es jedoch unmöglich, aus diesen Ergebnissen einen sicheren Schlufs zu ziehen.

II. Verlauf der subkutanen Milzbrandinfektion nach Vorbehandlung mit Hetol.

Bei den geringen Erfolgen der Hetolvorbehandlung gegen die intravenöse Infektion der Milzbrandkeime waren die Aussichten bei der subkutanen Impfung von vornherein nicht grofs. Trotzdem wurden auch einige derartige Versuche angestellt. Sie führten, wie aus dem im folgenden wiedergegebenen Versuchsprotokollen hervorgeht, zu ganz ähnlichen Resultaten wie sub I.

Über die angewandte Technik ist wenig vorauszuschicken. Die Hetolinjektion wurde nach denselben Regeln vorgenommen wie bei den früher angeführten Versuchen. Auch der Zeitabstand zwischen der Hetolabgabe und der Infektion war der gleiche. In einigen Fällen wurde am zweiten Versuchstage die Hetolinjektion wiederholt, da bei subkutaner Infektion beide Ohren zur Hetolinjektion frei waren. Die Infektion wurde stets in das subkutane Gewebe am Bauch vorgenommen und geschah stets unter aseptischen Kautelen.

Es wurden im ganzen sieben derartige Versuche angestellt, von denen zwei nicht mit aufgenommen wurden, da in beiden Fällen eine Reaktion der Kontrolltiere ausblieb. Es handelte

sich in diesen Fällen um einen Wurf deutscher Kaninchen, die gegen Milzbrand in den angewendeten Dosen nahezu immun zu sein schienen.

Protokolle.

A. Tödlich verlaufene Fälle.

(Die Versuche sind nach der Höhe der Dosen geordnet.)

10. Kaninchen 46. — Gewicht 1400 g.

25. X. 3^{15} Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.
6 Uhr: Infektion mit 180 Keimen unter die Bauchhaut.
26. X.: Gewicht 1320 g. Kein Ödem.
6 Uhr abends zweite Hetolinjektion.
27. X.: Gewicht 1220 g. Geringes Ödem an der Injektionsstelle,
12 Uhr mittags exitus.

Sektion: Geringes subkutanes Ödem an der Infektionsstelle, Milz vergrößert.

Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

11. Kaninchen 52. — Gewicht 1900 g.

6. XI. 10 Uhr vorm.: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.
12 Uhr mittags: Infektion mit 250 Milzbrandkeimen unter die Bauchhaut.
7. XI.: Gewicht 1720 g. Kein Ödem.
8. XI.: Starkes Ödem an der Infektionsstelle.
10^{30} Uhr vormittags exitus.

Sektion: Starkes, subkutanes Ödem an der Infektionsstelle, Milz vergrößert.

Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

12. Kaninchen 51. — Gewicht 2550 g.

6. XI. 10 Uhr vorm.: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.
12 Uhr mittags: Infektion mit 375 Keimen unter die Bauchhaut.
7. XI.: Gewicht 2370 g. Geringes Ödem.
8. XI.: Gewicht 2350 g. Geringes Ödem.
9. XI.: Gewicht 2400 g. Starke Vergrößerung des Ödems.
10. XI.: Exitus.

Sektion: Das subkutane Ödem erstreckt sich über den ganzen Bauch bis in die Inguinalgegend. Milz vergrößert.

Ausstriche: (Herzblut und Milzsaft) Reinkulturen von Milzbrand.

B. Günstig verlaufene Fälle.

13. Kaninchen. 53. — Gewicht 1810 g.
6. XI. 10 Uhr vorm.: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.
12 Uhr mittags: Infektion mit 125 Keimen unter die Bauchhaut.
7. XI.: Gewicht 1650 g. Kein Ödem.
8. XI.: Gewicht 1650 g. Kein Ödem.
9. XI.: Gewicht 1650 g. Kein Ödem.
10. IX.: Gewicht 1740 g. Kein Ödem.
Das Kaninchen bleibt am Leben und zeigt in der Folge keine Krankheitserscheinungen.

14. Kaninchen 45. — Gewicht 1600 g.
25. X. 3^{30} Uhr: Injektion von 10 ccm einer 5 proz. Hetollösung in eine Ohrvene.
6 Uhr: Infektion mit 360 Keimen unter die Bauchhaut.
26. X.: Gewicht 1650 g. Kein Ödem.
6 Uhr zweite Hetolinjektion.
27. X.: Gewicht 1620 g. Geringes Ödem am Bauch und an beiden Ohren. Bei den Hetolinjektionen war weden Enge der Venen etwas Hetol in das subkutane Gewebe der Ohren geraten
29. X.: Gewicht 1700 g. Die Ödeme bestehen noch.
30. X.: Gewicht 1720 g. Die Ödeme bestehen noch.
31. X.: Gewicht 1720 g. Die Ödeme sind vollständig resorbiert.
3. XI.: Gewicht 1770 g. Befinden gut.
17. XI.: Gewicht 1000 g. Das Tier zeigt keinerlei Krankheitserscheinungen.

Es sei auch hier wieder eine kleine Übersichtstabelle beigefügt:

Tabelle II.

Nr. des Versuchs	Zahl der eingebrachten Keime	Ödeme	Gewichtsveränderung in g	Tod an Milzbrand nach	Bemerkungen
13.	125	—	— 70	—	—
10.	180	+	— 180	2 Tagen	—
11.	250	+	— 180	2 »	—
14.	360	vorübergehend	+ 300	—	wahrscheinlich refraktär
12.	375	+	— 150	4 Tagen	—

Nach diesen Ergebnissen am lebenden Tiere war nicht zu erwarten, dafs die anthrakozide Kraft des Blutplasmas in vitro

gegen die Norm gesteigert sei. Es wurde aber, als Probe aufs Exempel ein diesbezüglicher Versuch angestellt, der sich, wie folgt, gestaltete:

Einem Kaninchen wurde die übliche Hetoldosis verabreicht, auf der Höhe der Wirkung Blut aus der Karotis entnommen und auf Plasma verarbeitet. Dabei wurde nach den Angaben von R. Schneider verfahren, und das Blut zu 4‰ mit dem gerinnungshemmenden Natriumzitrat versetzt. Nach sorgfältiger Ausschleuderung aller korpuskulären Elemente wurde 1,0 ccm des völlig klaren Plasmas mit 3000 Milzbrandkeimen beschickt, so dafs also in 0,1 ccm der Aufschwemmung ursprünglich etwa 300 Keime enthalten waren. Dann wurde das Gemisch bei 38° angesetzt und durch das Plattenverfahren sofort, nach 1, 3 und 7 Stunden die Keimzahl ermittelt.

Es ergaben sich folgende Zahlen:

Aussaat von 0,1 ccm der Aufschwemmung:

sofort	320	Keime
nach 1 Stunde	274	»
» 3 Stunden	240	»
» 7 » . . . . >	380	»

(Das Zeichen > erklärt sich daraus, dafs sich nach 7 Stunden eine aus Fibrin und Milzbrandfäden bestehende Flocke gebildet hatte und die Aufschwemmung daher keine gleichmäfsige mehr war.)

Es geht nicht wohl an, die unbedeutende Abnahme der obigen Zahlen auf die Wirkung einer bakteriziden Kraft zurückzuführen, und es dürfte somit auch in vitro der Beweis erbracht sein, dafs während der durch Hetol hervorgerufenen Hyperleukozytose keine anthrakoziden Substanzen in das Plasma abgegeben werden.

In ihren S. 6 zitierten Untersuchungen beobachteten Richter und Spiro nicht nur die Wirkung des Hetols auf die farblosen Blutelemente, sie stellten auch fest, dafs während des Ansteigens der Leukozytenzahl die Blutplättchen im arteriellen wie venösen Blut, in einigen Fällen bis zum völligen Verschwinden, abnahmen und nach Ablauf der Hyperleukozytose wieder in

normaler Zahl auftraten. Diese Angabe erweckte lebhaftes Interesse bei mir, da während meiner Arbeit Gruber und Futaki[1]) den Nachweis erbracht hatten, dafs die die Milzbrandbazillen tötende Substanz im Blutserum aus den Blutplättchen stamme und die unerwartete Einflufslosigkeit der Hyperleukozytose auf den Verlauf der Milzbrandinfektion vielleicht in dem gleichzeitigen Mangel der Blutplättchen im Blute seine Erklärung finden könnte. Nach den Versuchen von Gruber und Futaki sind die in den Kaninchenleukozyten enthaltenen anthrakoziden Stoffe wohl kaum von Bedeutung für die bakterizide Wirkung des Blutes, da sie in das Blutplasma anscheinend niemals abgegeben werden. Die milzbrandfeindliche Substanz des Kaninchenserums stammt anscheinend ausschliefslich aus den Blutplättchen und Gruber und Futaki machten es schon zur Zeit des Abschlusses dieser Untersuchungen zur Wahrscheinlichkeit, dafs diese Stoffe auf den Reiz der Milzbrandinfektion bereits im Tierkörper in das Blutplasma abgegeben werden.

Bei der Herstellung des Hetolplasmas hatte ich Gelegenheit, auf das Verhalten der Blutplättchen zu achten. Wären sie stark vermindert worden oder gar verschwunden, so hätte das von roten und farblosen Blutzellen befreite Plasma höchstens eine schwache oder gar keine Trübung mehr aufweisen dürfen. Es ergab sich jedoch eine ausgesprochene, dichte Trübung nach dem ersten Zentrifugieren, und am Schlufs der zweiten Ausschleuderung fand sich am Boden des Gläschens eine beträchtliche Menge von Blutplättchen, die der bei normalen Plasmen erzielten auf keinen Fall nachstand. Der Befund Richters und Spiros ist also gewifs kein gesetzmäfsiger.

Es ergibt sich, kurz wiederholt und zusammengefafst, aus der vorliegenden Arbeit:

1. dafs eine Steigerung der Resistenz des Kaninchens gegen Milzbrandinfektion durch die künstliche Vermehrung der

1) Münchener med. Wochenschrift, 1907, Nr. 6.

Leukozyten, wenn überhaupt, nur in ganz geringem Mafse möglich ist;

2. dafs das Kaninchenblutplasma auch auf der Höhe der Hetolhyperleukozytose keine bakterizide Kraft besitzt;
3. dafs die Zahl der Blutplättchen auf der Höhe der Hetolhyperleukozytose jedenfalls nicht immer vermindert ist.

Zum Schlufs sei es mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Obermedizinalrat Professor Dr. Max Gruber, für die wertvolle Anregung und das stets entgegengebrachte Wohlwollen bei der Arbeit meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

Bail, Archiv für Hygiene, Bd. 30.
Blumreich und Jacobi, Berliner klin. Wochenschr., 1897.
Buchner, Berliner klin. Wochenschrift, 1890, Nr. 47.
—, Münchener med. Wochenschrift, 1894.
—, Archiv für Hygiene, Bd. X u. XVII.
Charteris und Provan Cathart, Journ. Pathol. u. Bakteriol. 10 (zitiert nach Malys Jahresber. 1904/1905).
Crispino, Giorn intern. Scienza med., Nr. 21 (zitiert nach Baumgartens Jahresber. 1899).
Ehrlich und Lazarus, »Die Anämie«. Spez. Path. u. Therap. Notnagel, Bd. VIII, I. Teil, 1901.
Goldscheider und Jacob, Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 25.
Grammatschikoff, Annales de l'institut Pasteur, 1893.
Gruber, Verhandlungen des 14. Kongresses für innere Medizin. Wiesbaden 1896, S. 227.
—, Münchener med. Wochenschrift, 1901.
Gruber und Durham, Wiener klin. Wochenschrift, 1903, S. 1097.
Gruber und Futaki, Zentralblatt f. Bakt., Bd. 38, 1906, Beiheft.
— —, Münchener med. Wochenschrift, 1907, Nr. 6.
Hahn, Kolle-Wassermann IV, 1904.
—, Archiv f. Hygiene, Bd. 25, 26 und 28.
Hankin, Zentralblatt f. Bakteriol., Bd. 12 u. 14.
Havet, La cellule t. X., 1893.
Jacob, Zeitschrift f. klin. Medizin, Bd. 30.
Landerer, Münchener med. Wochenschrift, 1888 und 1889.
—, Deutsche med. Wochenschrift, 1890 und 1893.
—, »Die Behandlung der Tuberkulose mit Zimtsäure«, 1892. F. C. W. Vogel, Leipzig.

Landerer, Vortrag auf dem Tuberkulosekongrefs zu Berlin, 1899.
—, »Berliner Klinik«, 1901.
van Leent, Zentralblatt f. Bakteriol., Bd. 28, 1900.
Loewit, Zieglers Beiträge, Bd. 22.
—, »Physiologie und Pathologie des Blutes etc.« 1892. Fischer, Jena.
Loewy und Richter, Deutsche med. Wochenschr., 1895, Nr. 15.
— —, Virchows Archiv, Bd. 151.
Noetzel, Archiv f. klin. Chirurgie, 1897, 1898 und 1900.
Pawlowsky, Zentralbl. f. Bakteriol., 1894. Mitteilungen auf dem XI. internationalen Kongrefs.
Pfeiffer und Marx, Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten, Bd. 27.
Richter P., Virchows Archiv, Bd. 133, 1893.
Richter und Spiro, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 34.
Schattenfroh, Münchener med. Wochenschrift, 1897.
—, Archiv f. Hygiene, Bd. 31.
Schneider R., Münchener med. Wochenschrift, 1907, Nr. 3.
Schuster K., Inaugural-Dissertation, München 1894.
Spiro, Inaugural-Dissertation, Leipzig 1893.
Vaughan, Bericht vom Kongrefs in Budapest (Zentralbl. f. Bakt., Bd. 16)
Werigo, Annales de l'institut Pasteur, 1891.
Wooldridge, Archiv f. Anatom. u. Physiolog., physiolog. Abteil., Bd. 3.